

Doktori értekezés tézisei

**Epigenetikai módosítások hatásának és a cirkadián
ritmus zavarának vizsgálata a Huntington-kór
Drosophila modelljében**

Faragó Anikó

Témavezető: Dr. Bodai László
tanszékvezető egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged

2021

Bevezetés

Az egyre szélesebb körben végzett epigenetikai kutatásoknak köszönhetően tudjuk, hogy számos betegség esetén figyelhető meg az epigenetikai módosítások zavarának következtében kialakuló transzkripcionális diszreguláció. Ilyen betegség a Huntington-kór is, amely egy autoszómális, domináns öröklődésű, gyógyíthatatlan neurodegeneratív megbetegedés. A betegség legfőbb jellemzői az akaratlan „choreiform” izommozgások, a kognitív képességek romlása, illetve a viselkedésbeli és pszichiátriai tünetek. A Huntington-kór kialakulásáért a *Huntingtin* génben található poliglutamin domént kódoló CAG ismétlődés abnormális expanziója felelős, melynek következtében egy aggregációra hajlamos, toxikus, mutáns Huntingtin fehérje keletkezik. A neurodegeneráció egyik fő oka a transzkripció zavara, mely elsősorban a CBP és a Gcn5 hiszton acetiltransferázok mutáns Huntingtin általi gátlásához köthető, melyet a CBP túltermelése, illetve az antagonistá hiszton deacetyláz enzimek gátlása menekít. Ezek alapján a hisztonok acetilációs állapotának változása rendkívül nagy szereppel bír és potenciális terápiás célpont lehet, azonban a betegség szempontjából jelentős acetilációs target pozíciók még nem ismertek.

Számos neurodegeneratív megbetegedéshez hasonlóan a Huntington-kór esetén is megfigyelhető a cirkadián ritmus defektusa. A betegség során jelentkező cirkadián ritmus zavar szintén összefüggésbe hozható a CBP hiszton acetiltransferáz fehérjével, mely a cirkadián szabályozó CLK/ CYC transzkripció faktorokkal

alakít ki direkt kölcsönhatást. Mivel a Huntington-kór során a CBP az aggregátumokba csapdázódva gátlás alá kerül feltételezhető, hogy a betegség során fellépő cirkadián ritmus zavar hátterében is a CBP nem megfelelő működése áll. Általános zavar figyelhető meg a nyugalmi és aktív periódusokban, továbbá fragmentált, rendszertelen alvási periódusok jellemzőek, ami a betegség előrehaladtával egyre súlyosbodik, ezért rendkívül fontos megérteni az alvászavarok hátterében álló molekuláris folyamatokat is.

A Huntington-kór modellezéséhez *Drosophila melanogaster* idegrendszerében expresszáztattuk a patológiás hosszúságú poliglutamin (Q120) doménnel rendelkező humán *Huntingtin* gén (*mHtt*) első exonját. A modellben a betegség előrehaladtával jelentkező neurodegeneráció és aggregátum képződés, csökkent életképesség és élettartam, motoros képességek romlása, illetve a cirkadián ritmus zavara is vizsgálható.

Célkitűzések

Kutatásunk során olyan, a Huntington-kór pathogenezisével kapcsolatos jelenségeket vizsgáltunk a betegség *Drosophila* modelljében (HD legyek), melyekben szerepet játszanak a mutáns Huntingtin által csapdázott és gátolt hiszton acetiltransferáz enzimek.

- **A pathogenezist nagyban befolyásolja a hiszton fehérjék megfelelő acetiláltsági állapota, ezért terveink között szerepelt H3.3A hiszton variáns mutációs (*H3.3A-mut*) analízisével jellemezni a potenciális acetilációs target pozíciók módosításainak hatását, melyhez a következő kísérletek végrehajtását tűztük ki célul:**
 - Mutáns H3.3A hiszton variánsok sejtmagi transzportjának és kromatin kötöttségének validálása.
 - Mutáns H3.3A hiszton variánsok vad típusú állatok életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata.
 - Mutáns H3.3A hiszton variánsok HD legyek életképességére, élettartamára, neurodegenerációjára, motoros képességeire és napi aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata.
 - Az azonosított potenciális acetilációs target pozíciók validálása hiszton acetiltransferáz és hiszton deacetiláz enzimekkel végzett genetikai interakciós vizsgálatokkal.

- HD legyek transzkriptomikai analízise, valamint a potenciális acetilációs target pozíciók mutációinak transzkripciót befolyásoló hatásának vizsgálata.
- A potenciális acetilációs target pozíciók mutációinak hatásvizsgálata a sejtek totál RNS/DNS és polyA mRNS/ totál RNS arányára.
- **További tervünk a CBP hiszton acetiltransferáz Huntington-kór esetén megfigyelhető cirkadián ritmus zavar szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata volt, melyhez a következő kísérletek végrehajtását tűztük ki célul:**
 - HD legyek cirkadián ritmus zavarának részletes vizsgálata.
 - Cirkadián szabályozó gének expresszió változásának vizsgálata HD legyekben.
 - *dCBP* csendesítés cirkadián ritmusra gyakorolt hatásának vizsgálata.
 - *dCBP* overexpresszió HD legyek cirkadián ritmus fenotípusára gyakorolt hatásának vizsgálata.

Alkalmazott módszerek

- Neuronálisan expresszált *mHtt* és *H3.3A-mut* expressziós szintek validálása **RT-qPCR**-ral.
- A H3.3A hiszton variáns poszt-transzlációs módosításait mimikáló pontmutáns transzgénekre képződő fehérjék sejtmagi transzportjának és kromatin kötöttségének validálása **hiszton sóelúciót követő western blot** analízissel.
- H3.3A mutáns transzgének vad típusú állatok életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata **kikelés analízissel**.
- H3.3A mutáns transzgének életképességre, élettartamra, neurodegenerációra, motoros képességekre és napi aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata Huntington-kór modellben **kikelés és túlélés analízissel**, **pseudopupil assay**-el, **mászási teszttel** és **Trikinetics aktivitás méréssel**.
- Az azonosított potenciális acetilációs target pozíciók validálása: Gcn5 hiszton acetiltranszferáz és Sirt1 hiszton deacetiláz enzimek funkcióvesztésének vizsgálata **kikelés és túlélés analízissel**, valamint **pseudopupil assay**-el.
- HD legyek transzkriptomikai analízise, valamint a potenciális acetilációs target pozíciók mutációinak transzkripciót befolyásoló hatásának vizsgálata **RNS-szekvenálással**.

- A potenciális acetilációs target pozíciók mutációjának a sejtek RNS/DNS és polyA mRNS/ totál RNS arányára gyakorolt hatásának vizsgálata **RNS-DNS és polyA mRNS izolálással**.
- HD legyek cirkadián ritmus zavarának részletes vizsgálata **Trikinetics aktivitás méréssel**.
- Cirkadián szabályozó gének expresszió változásának vizsgálata HD legyekben **RT-qPCR**-ral.
- *dCBP* csendesítés és *dCBP* overexpresszió HD legyek cirkadián ritmus fenotípusára gyakorolt hatásának vizsgálata **Trikinetics aktivitás méréssel és RT-qPCR**-ral.

Eredmények

- Kísérleteinkhez a H3.3A variáns hiszton poszt-transzlációs módosításait mimikáló transzgéneket használtunk, melyekben a lizint glutaminra cserélve (K → Q) az acetilált, argininre cserélve a nem módosított (K → R), metioninra cserélve pedig a metilált (K → M) módosítást mimikáljuk. Kimutattuk, hogy a különböző mutáns H3.3A hiszton variánsok megfelelően expresszálódnak, sejtmagi lokalizációt mutatnak és megfelelő módon képesek beépülni a kromatinba.
- A H3.3A-K27M módosítás kivételével a mutációk nem befolyásolják a vad típusú állatok életképességét.
- A H3.3A-K9 és H3.3A-K27 pozíciók módosítása nincs jelentős hatással a Huntington-kór pathogenezésére.
- A H3.3A-K14Q acetilált lizint mimikáló módosítás hatására javul a HD legyek életképessége, élettartama és mászási képessége, a neurodegeneráció mértéke csökken, valamint mérséklődik a cirkadián zavar következtében kialakuló hiperaktivitás is.
- A H3.3A-K14R nem módosítható lizint mimikáló mutáció hatására súlyosbodik a HD legyek összes vizsgált fenotípusa.
- A H3K14 specifikus Gcn5 hiszton acetiltransferáz funkcióvesztésének következtében a HD legyek fenotípusa

súlyosbodik, míg a Sirt1 hiszton deacetiláz funkcióvesztése menekítő hatással bír.

- A H3.3A-K14Q állandó acetilációt mimikáló hiszton variáns jelenlétében azonban a Gcn5 funkcióvesztése nincs hatással a HD legyek javulást mutató fenotípusaira, míg a Sirt1 funkcióvesztése enyhe mértékben tovább javít azokon.
- A HD legyekben jelentős mértékű transzkripcionális diszreguláció figyelhető meg. A változást mutató gének közel 90 %-a downregulálódik, érdekes azonban, hogy egyes hősokk gének expressziója emelkedik.
- A transzkriptomikai változásokat jelentős mértékben nem befolyásolja a H3.3A-K14 pozíció egyik módosítása sem.
- Az öregedés során a HD legyekben a neurodegeneráció következtében csökken a DNS és totál RNS mennyisége is. Azonban a totál RNS/ DNS arány nem változik, míg nő a polyA mRNS/ totál RNS mennyiségének aránya.
- A HD kontrollhoz képest a H3.3A-K14Q módosítás hatására a totál RNS/ DNS arány, tehát általánosságban az RNS-ek mennyisége megnő HD legyekben, míg a H3.3A-K14R módosítás következtében csökken. Érdekes azonban, hogy a polyA mRNS aránya, tehát a fehérjét kódoló gének transzkripciójának mértéke mindkét módosítás hatására jóval alacsonyabb.

- A cirkadián ritmus vizsgálataink eredményei alapján a HD legyek magasabb napi aktivitást mutatnak és ezzel párhuzamosan kevesebb időt töltenek alvással, továbbá a nyugalmi állapot elérése hosszabb időt vesz igénybe. Emellett az alvással töltött idejük fragmentáltabb, nő az alvási epizódok száma, hosszuk azonban csökken.
- A HD legyekben jelentős változások figyelhetők meg a *per*, *tim*, *vri* és *dClk* gének expressziós mintázatában, melyek feltételezhetően hozzájárulnak a cirkadián ritmus defektus kialakulásához.
- A *dCBP* gén csendesítésének hatására egészséges legyekben nagyon hasonló cirkadián ritmusbeli és génexpressziós zavarok jelentkeznek, mint amit a HD legyek esetén megfigyeltünk.
- A *dCBP* overexpressziója teljes mértékben menekíteni képes a HD legyek alvászavarait és a cirkadián szabályozó gének expressziója is helyreáll.

Összefoglalás

A Huntington-kór *Drosophila* modelljében olyan jelenségeket vizsgáltunk, melyek a mutáns Huntingtin fehérje által csapdázott hiszton acetiltransferázok hiányában alakulnak ki, így hozzájárulnak a betegség pathogenezéséhez.

A hiszton acetiltransferázok a hisztonok megfelelő acetilációs állapotának kialakításán keresztül szabályozzák a transzkripciót, mely a betegség során diszregulációt szenved. A CBP és a Gcn5 acetilációs target pozícióinak mutáns analízisével azonosítottuk a H3K14 pozíciót, melynek acetilált állapotát mimikálva menekíthető a Huntington-kór számos tünete, míg annak nem módosított lizint mimikáló mutációja tovább súlyosbítja azokat. Eredményeink alapján tehát a H3K14 pozíció acetilációja potenciális terápia target lehet a betegség gyógyításában.

A CBP továbbá részt vesz a cirkadián ritmus szabályozásában is, mely a Huntington-kór progressziója során szintén zavart szenved. A CBP funkcióvesztéses vizsgálatával hasonló cirkadián ritmusbeli zavarokat figyeltünk meg, mint a Huntington-kór modellezése esetén, valamint a CBP túltermelésével menekítettük a cirkadián ritmus zavarokat a Huntington-kór modellben, azonban a CBP cirkadián ritmus szabályozásban betöltött pontos szerepe még tisztázásra vár.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10055600

A dolgozat alapját képző publikációk:

- **Faragó A**, Zsindely N, Bodai L. Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in *Drosophila*. *Sci Rep.* 2019 May 9;9(1):7174. doi: 10.1038/s41598-019-43612-w.

IF: 4,149

- Song W, Zsindely N, **Faragó A**, Marsh JL, Bodai L. Systematic genetic interaction studies identify histone demethylase Utx as potential target for ameliorating Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2018 Feb 15;27(4):649-666. doi: 10.1093/hmg/ddx432.

IF: 4,544

További tudományos publikációk:

- **Faragó A**, Ürmösi A, Farkas A, Bodai L. The histone replacement gene His4r is involved in heat stress induced chromatin rearrangement. *Sci Rep.* 2021 Mar 1;11(1):4878. doi: 10.1038/s41598-021-84413-4. **IF: 3,998**

- Valkai I, Kénesi E, Domonkos I, Ayaydin F, Tarkowská D, Strnad M, **Faragó A**, Bodai L, Fehér A. The Arabidopsis RLCK VI_A2 Kinase Controls Seedling and Plant Growth in Parallel with

Gibberellin. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 1;21(19):E7266. doi: 10.3390/ijms21197266. **IF: 4,556**

- Spohn R, Daruka L, Lázár V, Martins A, Vidovics F, Grézal G, Méhi O, Kintses B, Számel M, Jangir PK, Csörgő B, Györkei Á, Bódi Z, **Faragó A**, Bodai L, Földesi I, Kata D, Maróti G, Pap B, Wirth R, Papp B, Pál C. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun.* 2019 Oct 4;10(1):4538. doi: 10.1038/s41467-019-12364-6. **IF: 12,121**

- Dunai A, Spohn R, Farkas Z, Lázár V, Györkei Á, Apjok G, Boross G, Szappanos B, Grézal G, **Faragó A**, Bodai L, Papp B, Pál C. Rapid decline of bacterial drug-resistance in an antibiotic-free environment through phenotypic reversion. *Elife.* 2019 Aug 16;8:e47088. doi: 10.7554/eLife.47088. **IF: 7,080**

- Jankovics F, Bence M, Sinka R, **Faragó A**, Bodai L, Pettkó-Szandtner A, Ibrahim K, Takács Z, Szarka-Kovács AB, Erdélyi M. *Drosophila* small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation. *Development.* 2018 Dec 4;145(23):dev170639. doi: 10.1242/dev.170639. **IF: 5,763**

Összesített impakt faktor: 42,211

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Bodai László, Faragó Anikó doktorjelölt témavezetőjeként kijelentem, hogy a jelölt doktori értekezése és annak tézisei az általa végzett önálló munka eredményeit tükrözik. A disszertációhoz felhasznált „*Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in Drosophila. Sci Rep. 2019 May 9;9(1):7174.*” és „*Systematic genetic interaction studies identify histone demethylase Utx as potential target for ameliorating Huntington's disease. Hum Mol Genet. 2018 Feb 15;27(4):649-666.*” című közlemények létrehozásához a jelölt jelentős mértékben hozzájárult, továbbá azok nem kerültek más fokozatszerzési eljárásban felhasználásra.

Szeged, 2021. május 28.

.....

Dr. Bodai László

tanszékvezető egyetemi docens

SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék